

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 5/06 // A61K 39/12	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/09937 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Juli 1991 (11.07.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT91/00003 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Januar 1991 (03.01.91) (30) Prioritätsdaten: A 18/90 4. Januar 1990 (04.01.90) AT (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestraße 67, A-1221 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MUNDT, Wolfgang [AT/AT]; Florianigasse 57/6, A-1080 Wien (AT). WÖHRER, Wilfried [AT/AT]; Flugfeldstraße 21, A-2540 Bad Vöslau (AT). DÖRNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT).	(74) Anwalt: WOLFRAM, Gustav; Schwindgasse 7, P.O. Box 205, A-1041 Wien (AT). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), SU, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: BIOMASS FOR THE PRODUCTION OF VIRUSES/VIRUS ANTIGENS (54) Bezeichnung: BIOMASSE ZUR PRODUKTION VON VIRUS/VIRUSANTIGEN (57) Abstract A biomass for producing viruses/virus antigens is composed of cell aggregates having a diameter between 100 µm and 1000 µm. In suspension in a culture medium, the biomass disclosed has high metabolic activity and is inoculated with a virus. It makes possible the large scale production of pure viruses/virus antigens and is particularly useful for producing FSME-viruses/virus antigens. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine Biomasse zur Produktion von Virus/Virusantigenen, welche aus Zellaggregaten mit einem Durchmesser zwischen 100 µm und 1000 µm besteht. Die erfindungsgemäße Biomasse besitzt in Suspension im Kulturmedium eine hohe metabolische Aktivität und ist mit Virus infiziert. Sie gestattet die großtechnische Produktion von reinem Virus/Virusantigen und eignet sich insbesondere zur Produktion von FSME-Virus/Virusantigenen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Biomass zur Produktion von Virus/Virusantigen

Die Erfindung betrifft eine Biomasse und ein Verfahren zur Produktion von Virus/Virusantigen.

Verfahren zur Herstellung von Virus/Virus-Antigen sind bekannt. Ausgangsmaterialien sind häufig sogenannte Primärzellkulturen, die aus menschlichen oder tierischen Geweben gewonnen werden. Diese Primärzellen werden mit Virus ("Saatvirus") infiziert und durch die Virusvermehrung wird Virusantigen gebildet.

Eine Methode zur Vermehrung beispielsweise des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) wird in der AT -B 358.167 beschrieben: Hühnerembryonalzellen werden in einem Zellkulturmedium suspendiert, mit dem Virus infiziert und als Biomasse zur Produktion von FSME-Virusantigen verwendet. Dazu wird die Biomasse unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur zwischen 25 und 38 °C zwischen einem und fünf Tagen in Suspension gehalten. Dann werden die Zellen und Zellbruchstücke durch Zentrifugieren abgetrennt, die erhaltene Virussuspension mittels Formalin oder β -Propiolacton inaktiviert und das Virusantigen durch Ultrafiltration konzentriert, gereinigt und in üblicher Weise zu Vakzinen weiterverarbeitet.

Bei üblichen Präparationen von Primärzellkulturen wird besonders darauf Wert gelegt, Einzelzellen oder möglichst kleine Zellverbände zu erhalten. Um dies zu erreichen, muß das Gewebe möglichst stark mechanisch und enzymatisch zerkleinert werden. Die Behandlung führt jedoch gleichzeitig auch zum Absterben vieler Zellen. Werden solche Zellpräparationen an der Oberfläche geeigneter Trägermaterialien angesiedelt, bleiben tote Zellen im Überstand und können entfernt werden. Bei Verwendung solcher Zellpräparationen in Suspensionskulturen für die Herstellung von FSME-Virusantigen gibt es jedoch keine Möglichkeit, lebende Zellen von toten bzw. geschädigten Zellen zu trennen. Die mit der Zeit

stattfindende Lyse der Zellen führt in der Folge zu einer hohen Verunreinigung an Zellproteinen im Medium, die schwer von dem gewünschten Produkt abgetrennt werden können.

Auch die Reproduzierbarkeit der Virus/Virusantigen-Herstellung ist bei Verwendung von Einzelzellen oder kleinen Zellaggregaten in Suspension gering, da es zu einer starken Zellschädigung z.B. durch Scherkräfte beim Rühren kommt.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, diese Nachteile zu beseitigen und somit eine Biomasse zur Produktion von Virus/Virusantigen zur Verfügung zu stellen, welche bei Kultivierung eine hohe Produktionsleistung an Virus/Virusantigen entwickelt, einfach zu handhaben ist und im großtechnischen Maßstab zur Produktion von Virus/Virusantigen verwendet werden kann, wobei das Virus/Virusantigen aus dem Kulturmedium in hoher Reinheit gewonnen werden kann.

Die erfindungsgemäße Biomasse, die den genannten Anforderungen entspricht, besteht aus Zellaggregaten mit einem Durchmesser zwischen 100µm und 1000µm, ist mit Virus infiziert.

Die Zellaggregate der erfindungsgemäßen Biomasse können durch mechanische und enzymatische Behandlung menschlicher oder tierischer Gewebe erhalten werden, wobei das auf mechanische Weise desintegrierte Gewebe zur weiteren Auflösung der Zellverbände mit einer Protease wie Trypsin, Chymotrypsin oder Elastase bis zur gewünschten Größe der Zellaggregate weiter zerkleinert werden kann.

Die Zellaggregate der erfindungsgemäßen Biomasse können aber auch aus menschlichen oder tierischen Einzelzellen erhalten werden, indem diese mit zellaggregierenden Substanzen, wie Agglutinin, behandelt werden.

Die Abtrennung von Zellaggregaten und Einzelzellen mit einem Durchmesser von größer als $1000\mu\text{m}$ bzw. kleiner als $100\mu\text{m}$ kann durch Sieben oder vorzugsweise durch Sedimentieren vorgenommen werden. Die Sedimentation ist im Vergleich zur Siebung einfacher durchzuführen, da Siebe mit einer Porengröße von $100\mu\text{m}$ sehr leicht verstopfen. Weiters kommt die Sedimentation ohne aufwendige und teure Separatoren aus und bietet auch Vorteile in steriltechnischer Hinsicht. Es hat sich gezeigt, daß die Zellaggregate mit einem Durchmesser zwischen $100\mu\text{m}$ und $1000\mu\text{m}$ mit einer Geschwindigkeit von größer als 1 cm/min sedimentieren, während die kleineren Zellaggregate mit einer Geschwindigkeit von weniger als 1 cm/min sedimentieren. Die Abtrennung der Partikel mit einer Größe von kleiner als $1000\mu\text{m}$ kann einfach mit Sieben erfolgen, da hier die Gefahr einer Verstopfung gering ist.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Biomasse ist dadurch gekennzeichnet, daß sie in im Kulturmedium suspendiertem Zustand eine hohe metabolische Aktivität besitzen; gemessen am Glucoseverbrauch beträgt die metabolische Aktivität pro Stunde zwischen 3 und 5 mg Glucose pro Gramm Biomasse.

Die zur Bereitung der erfindungsgemäßen Biomasse verwendeten Zellaggregate besitzen weiters den Vorteil, daß sie bereits bei einer Infektion mit einer relativ kleinen Menge an Saatvirus große Mengen an Virusantigen produzieren. Es hat sich gezeigt, daß zur Infektion von Zellaggregaten, die kleiner als $100\mu\text{m}$ oder größer als $1000\mu\text{m}$ sind, wesentlich mehr Saatvirus verwendet werden muß, um die gleiche Menge an Virus/Virusantigen zu produzieren.

Die Virus/Virusantigenproduktion kann weiter gesteigert werden, wenn die erfindungsgemäße Biomasse bei einer Sauerstoffkonzentration von mindestens $0,01\text{ mmol/l}$, vorzugsweise von mindestens $0,06\text{ mmol/l}$ im Kulturmedium gehalten wird.

Es ist vorteilhaft, wenn das Kulturmedium eine Konzentration an Zellaggregaten von mindestens 10mg Zellaggregate pro ml aufweist.

Die erfindungsgemäße Biomasse eignet sich besonders gut zur Produktion von Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus(FSME-Virus)/Virusantigen, wenn sie aus Zellaggregaten von Vogelembryonalzellen, insbesondere von Hühnerembryonalzellen besteht, wobei eine Virus/Virusantigen-Produktionsleistung weiter erhöht wird, wenn im Kulturmedium eine Sauerstoff-Transfer-Rate von größer als 1,60 mmol $O_2 \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$, vorzugsweise zwischen 1,65 und 2,40 mmol $O_2 \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$, eingestellt wird.

Die Sauerstoff-Transfer-Rate (oxygen transfer rate, OTR), ausgedrückt in mmol $O_2 \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$, ist bekanntlich ein Maß für die Einbringung von Sauerstoff in die Zellkultur. Die Sauerstoff-Aufnahme-Rate (oxygen uptake rate, OUR) ist wiederum ein Maß für die metabolische Leistung einer Zelle allgemein und somit indirekt für die Virus/Virusantigen-syntheseleistung einer Zelle.

Bei allen heute bekannten Methoden zur Produktion von FSME-Virusantigen ist die spezifische Produktionsleistung an Virus-Antigen beschränkt, da es bei Vorhandensein einer großen Menge an infizierten Zellen im Kulturmedium zu einem Absinken seines pH-Wertes und damit zu einer unerwünschten Inaktivierung des Virustiters und Zerstörung des Virusantigens kommen kann.

Es wurde gefunden, daß der pH-Wert einer solchen stark belüfteten Kultur nicht absinkt, und daß eine konstante und hohe Produktionsleistung an Virus/Virusantigen aufrecht erhalten werden kann, wenn in die Kulturflüssigkeit ausreichende Mengen an Sauerstoff z.B. durch Einrühren oder

mittels statischer und/oder dynamischer Gasverteiler eingetragen werden.

Messungen haben ergeben, daß sich bei einer Kultur mit einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen pro Milliliter, die ausschließlich über ihre Oberfläche mit der Sauerstoff-Atmosphäre in Verbindung steht, die FSME-Produktion in größerem Maßstab stark reduziert. Wird Sauerstoff hingegen aktiv in die Kultur eingetragen, so kann die Antigenausbeute stark gesteigert werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß eine Sauerstoff-Transfer-Rate von größer als $1,65 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, vorzugsweise zwischen $1,65$ und $2,40 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, eingestellt wird, wobei die Feuchtzellmasse am besten maximal 30 g pro Liter Kulturmedium beträgt.

Versuche haben ergeben, daß die FSME-Virus/Virusantigenproduktion der Konzentration an erfindungsgemäß verwendeten Zellaggregaten proportional ist. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch bei einer Zellaggregatkonzentration von weniger als 10 mg/ml ausführbar. Im Gegensatz dazu wurde festgestellt, daß im Falle der Kultivierung von infizierten Einzelzellen eine Mindestkonzentration von 10 mg/ml für eine Virus/Antigenproduktion unbedingt erforderlich ist.

Die zur Infektion einer Primärzellkultur benötigten hohen Saatvirustiter werden üblicherweise nur durch Vermehrung des Virus in Maushirn erreicht. Dadurch, daß Zellaggregate gemäß der Erfindung mit einer wesentlich geringeren Virusmenge infiziert werden können, kann das zur Infektion der Biomasse benötigte Saatvirus auch aus Zellkulturüberständen gewonnen werden. Dies verringert deutlich die Möglichkeit einer Kontamination mit Maushirnprot in.

Es hat sich weiters gezeigt, daß sich die erfindungsgemäße Biomasse bestehend aus Zellaggregaten von Vogelembryonalzellen ebenso zur Produktion von Influenza-, Vaccinia- oder Avipox-Virusantigen eignet.

Mit den nachfolgenden Ausführungsbeispielen wird die Erfindung noch näher erläutert.

Beispiel 1: Einfluß der Zellaggregatgröße auf die Antigenausbeute

SPF-(specific pathogen free)-Hühnereier wurden 12 Tage bei 37°C bebrütet, mit einem Schliergerät auf erfolgtes Embryowachstum geprüft, mit Alkohol desinfiziert und in einer Sterilbox geöffnet. Die Embryonen wurden entnommen, gewaschen und mit einer Schneidevorrichtung grob zerkleinert. Anschließend erfolgte ein enzymatischer Verdau des embryonalen Gewebes durch Zugabe von proteolytischen Enzymen (1 mg/Embryo) bei 37°C während 20 Minuten. Aus dieser Gewebesuspension wurden Gewebestücke $> 1000 \mu\text{m}$ über ein Sieb mit $> 1000 \mu\text{m}$ entsprechender Maschenweite abgetrennt. Eine weitere Auftrennung dieser Zellaggregate konnte durch ein Sedimentationsverfahren erreicht werden, wobei als Trennkriterium eine Sedimentationsrate von $\geq 1 \text{ cm/min.}$ gewählt wurde. Dazu wurde die Zellsuspension mit einer Flußrate von 1 cm/min. von unten nach oben durch ein Sedimentationsgefäß gepumpt. Einzelzellen bzw. kleine Zellaggregate blieben in Suspension, während größere Zellverbände sich am Boden des Gefäßes absetzten. Untersuchungen mittels Sieben verschiedener Porengrößen zeigten, daß die sich unter diesen Bedingungen absetzenden Zellverbände eine Größenverteilung von $< 1000 \mu\text{m}$, $> 100 \mu\text{m}$ aufwiesen. Die Größe der in Suspension verbleibenden Zellverbände war demnach $< 100 \mu\text{m}$.

Auf diese Weise wurden drei Fraktionen von Zellaggregaten erhalten

1. < 100 μm
2. > 1000 μm
3. < 1000 μm > 100 μm

Von diesen Fraktionen wurden jeweils gleiche Biomasse-Konzentrationen (30 g pro Liter) in einem Kulturmedium (Med 199) suspendiert und mit FSME Virus (1×10^5 pfu pro mg Biomasse) infiziert. Die Virusvermehrung erfolgte bei 37°C, wobei die Zellen unter gleichmäßigem Rühren in Suspension gehalten wurden. Nach vier Tagen wurde die gebildete Virusantigenmenge mittels ELISA bestimmt.

Im Falle der Fraktion 1 (Zellaggregate kleiner als 100 μm) betrug die Virus/Virusantigenproduktion 4,9 $\mu\text{g/ml}$; im Falle der Fraktion 2 (Zellaggregate größer als 1000 μm) betrug die Virus/Virusantigenproduktion 4,7 $\mu\text{g/ml}$; im Falle der erfindungsgemäß verwendeten Fraktion betrug die Virus/Virusantigenproduktion 9,3 $\mu\text{g/ml}$.

Beispiel 2: Einfluß der Zellaggregatgröße auf die Verunreinigung mit CEC(chick embryo cell)-Protein

Die im Beispiel 1 erhaltenen Kulturmedien der Fraktionen 1 und 3 wurden zwei Tage nach Beginn der Kultivierung auf ihren Gehalt an CEC-Protein untersucht. Das Kulturmedium der Fraktion 1 enthielt 1,80 mg CEC-Protein/ml, während im Kulturmedium der Fraktion 3 lediglich 0,84 mg CEC-Protein/ml festgestellt wurden.

Beispiel 3: Einfluß der Menge an Saatvirus auf die Virus/Antigenproduktion

Es wurden, wie in Beispiel 1 b beschrieben, Biomassen mit Zellaggregatgrößen der Fraktionen 1 und 3 kultiviert und die Virus/Antigenproduktion bestimmt, wobei pro Fraktion vier verschieden hohe Mengen an Saatvirus ($3,2 \cdot 10^3$ pfu, $1 \cdot 10^4$ pfu, $3,2 \cdot 10^4$ pfu und $1 \cdot 10^5$ pfu, jeweils pro mg Biomasse) zur Infektion verwendet wurden. Die Ergebnisse sind aus der folgenden Tabelle 1 zu ersehen, woraus sich ergibt, daß die erfindungsgemäß verwendete Fraktion 3 bei gleicher Menge an Saatvirus eine wesentlich größere Produktion an Virus/Virusantigen aufweist.

Tabelle 1

Menge an Saatvirus zur Infektion (pfu pro mg Biomasse)	Virus/Virusantigenausbeute ($\mu\text{g/ml}$)	
	Fraktion 1	Fraktion 3
$3,2 \cdot 10^3$ pfu	2,0 $\mu\text{g/ml}$	8,8 $\mu\text{g/ml}$
$1 \cdot 10^4$ pfu	3,2 $\mu\text{g/ml}$	10,3 $\mu\text{g/ml}$
$3,2 \cdot 10^4$ pfu	5,0 $\mu\text{g/ml}$	11,0 $\mu\text{g/ml}$
$1 \cdot 10^5$ pfu	5,0 $\mu\text{g/ml}$	11,0 $\mu\text{g/ml}$

Beispiel 4: Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Antigenproduktion

Gemäß den in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen wurde die erfindungsgemäße Biomasse bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen im Kulturmedium kultiviert und die Menge an Virus/Virusantigen bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 wiedergegeben, wobei die Ausbeute an Virus/Virusantigen unter einer Sauerstoffkonzentration von 0,06 mmol/l mit 100% gerechnet wurde.

Tabelle 2

Sauerstoffkonzentration	Ausbeute an Virus/Virusantigen
0,06 mmol/l	100%
0,02 mmol/l	90%
0,004 mmol/l	35%
0	10%

Beispiel 5: Einfluß des Sauerstofftransfers auf die Virus/Antigenausbeute

Es wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, Biomasse mit den Zellaggregaten der Fraktion 3 mit Virus infiziert, in verschiedenen großen Kulturgefäßen kultiviert und mit Luft begast, um verschiedene OTR-Werte zu erhalten. Die Suspension wurde 4 Tage bei einer Temperatur von 33°C - 37°C gehalten und die Virus/Antigenausbeute bestimmt. (Siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

Kulturgefäß	Arbeitsvolumen	OTR	Virus/Antigen- ausbeute
0,5 l Spinner	0,1	2,38	5,9
(Technespinner)	0,3	0,795	0,97
2 l Spinner	0,3	1,65	2,0
(Technespinner)	1,0	0,49	0,32
10 l Rührflasche			
(Rührerlänge 5,5 cm,	3,0	0,41	0,38
150 - 160 Upm)			
50 l Rührflasche			
(Rührerlänge 15 cm,	18	1,10	0,97
80 - 90 Upm)	30	0,87	0,22

Arbeitsvolumen: Liter, OTR: $\text{mmol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,

Virus/Antigenausbeute: $\mu\text{g/ml}$ (bestimmt
mittels ELISA).

Aus den in Tabelle 3 angegebenen Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß bei einer OTR von größer als 2 Virus/Antigenausbeuten von etwa 6 $\mu\text{g/ml}$ erzielt werden können.

Patentansprüche:

1. Biomasse zur Produktion von Virus/Virusantigen, dadurch gekennzeichnet, daß die Biomasse aus Zellaggregaten mit einem Durchmesser zwischen 100µm und 1000µm besteht, welche Biomasse mit Virus infiziert ist.
2. Biomasse nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellaggregate durch mechanische und enzymatische Behandlung menschlicher oder tierischer Gewebe erhalten sind.
3. Biomasse nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellaggregate aus menschlichen oder tierischen Einzelzellen durch Behandeln mit zellaggregierenden Substanzen erhalten sind.
4. Biomasse nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die metabolische Aktivität der im Kulturmedium suspendierten Biomasse, gemessen am Glucoseverbrauch, pro Stunde zwischen 3 und 5 mg Glucose pro Gramm Biomasse beträgt.
5. Verfahren zur Produktion von Virus/Virusantigen unter Verwendung einer Biomasse nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Kulturmedium bei einer Sauerstoffkonzentration von mindestens 0,01 mmol/l, vorzugsweise von mindestens 0,06 mmol/l, durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Kulturmedium durchgeführt wird, welches mindestens 10mg Zellaggregate pro ml aufweist.
7. Verwendung einer Biomasse nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bestehend aus Zellaggregaten von Vogelembryonalzellen, insbesondere von Hühnerembryonalzellen, nach einem Verfahren gemäß Anspruch 6, zur Produktion von Frühsommer-

Meningoenzephalitis-Virus(FSME-Virus)/Virusantigen.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß im Kulturmedium eine Sauerstoff-Transfer-Rate von größer als $1,60 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, vorzugsweise zwischen 1,65 und 2,40 $\text{mmol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, eingestellt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß bei einer Sauerstoff-Transfer-Rate von $1,65 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ eine Biomasse von maximal 30 g pro Liter Kulturmedium eingestellt wird.

10. Verwendung einer Biomasse nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bestehend aus Zellaggregaten von Vogelembryonalzellen, nach einem Verfahren der Ansprüche 6 oder 7 zur Produktion von Influenza-, Vaccinia- oder Avipox-Virus/Virusantigen.

11. Verwendung von Zellaggregaten mit einem Durchmesser zwischen $100 \mu\text{m}$ und $1000 \mu\text{m}$ zur Herstellung einer Biomasse nach Anspruch 1.

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International Application No PCT/AT91/00003

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl.5 C12N 5/06// ; A61K 39/12																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Classification System</th> <th style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Int.Cl.5</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">C12N, A61K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl.5	C12N, A61K											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl.5	C12N, A61K																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4195130 (YASUTAKA HOSHINO) 25 March 1980; see column 2, line 27- column 3, line 16 -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-2,11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">ACTA VIROLOGICA Vol. 27, March 1983, Prague pages 97-104; I. Slavik et al: "Optimalized conditions of Tick-borne encephalitis virus production in vitro" see the whole document -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1,11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4059485 (WILLIAM R. TOLBER) 22 November 1977 see the whole document -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">FR, A, 2444466 (IMMUNO AKTIEN.) 18 July 1980; see the whole document (cited in the application) -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-11</td> </tr> </tbody> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	X	US, A, 4195130 (YASUTAKA HOSHINO) 25 March 1980; see column 2, line 27- column 3, line 16 -----	1-2,11	A	ACTA VIROLOGICA Vol. 27, March 1983, Prague pages 97-104; I. Slavik et al: "Optimalized conditions of Tick-borne encephalitis virus production in vitro" see the whole document -----	1,11	A	US, A, 4059485 (WILLIAM R. TOLBER) 22 November 1977 see the whole document -----	1-11	A	FR, A, 2444466 (IMMUNO AKTIEN.) 18 July 1980; see the whole document (cited in the application) -----	1-11
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
X	US, A, 4195130 (YASUTAKA HOSHINO) 25 March 1980; see column 2, line 27- column 3, line 16 -----	1-2,11															
A	ACTA VIROLOGICA Vol. 27, March 1983, Prague pages 97-104; I. Slavik et al: "Optimalized conditions of Tick-borne encephalitis virus production in vitro" see the whole document -----	1,11															
A	US, A, 4059485 (WILLIAM R. TOLBER) 22 November 1977 see the whole document -----	1-11															
A	FR, A, 2444466 (IMMUNO AKTIEN.) 18 July 1980; see the whole document (cited in the application) -----	1-11															
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>																	
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 9 April 1991 (09.04,91) </td> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 21 May 1991 (21.05.91) </td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> International Searching Authority European Patent Office </td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 9 April 1991 (09.04,91)	Date of Mailing of this International Search Report 21 May 1991 (21.05.91)	International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search 9 April 1991 (09.04,91)	Date of Mailing of this International Search Report 21 May 1991 (21.05.91)																
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer																

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/AT 91/00003**

SA 43174

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 09/04/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4195130	25-03-80	None	
US-A-4059485	22-11-77	BE-A- 860413	03-05-78
		CA-A- 1093994	20-01-81
		DE-A, C 2749022	18-05-78
		FR-A, B 2370095	02-06-78
		GB-A- 1535490	13-12-78
		JP-C- 1401531	28-09-87
		JP-A- 53059091	27-05-78
		JP-B- 62009318	27-02-87
		SE-B- 432778	16-04-84
		SE-A- 7712376	04-05-78
FR-A-2444466	18-07-80	AT-A- 358167	25-08-80
		BE-A- 880732	16-04-80
		CH-A- 644271	31-07-84
		DE-A, C 2950004	03-07-80
		GB-A, B 2038179	23-07-80
		SE-B- 447789	15-12-86
		SE-A- 7910054	23-06-80
		SU-A- 1318149	15-06-87

EPO FORM P477

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 91/00003

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N 5/06// ; A61K 39/12		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12N ; A61K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	US,A,4195130 (YASUTAKA HOSHINO) 25 März 1980 siehe Spalte 2, Zeile 27 - Spalte 3, Zeile 16 ---	1-2, 11
A	ACTA VIROLOGICA vol. 27, März 1983, Prague Seiten 97 - 104; I. Slavik et al: "Optimalized conditions of Tick-borne encephalitis virus production in vitro" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	US,A,4059485 (WILLIAM R. TOLBER) 22 November 1977 siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	FR,A,2444466 (IMMUNO AKTIEN.) 18 Juli 1980 siehe das ganze Dokument (in der Anmeldung erwähnt) ---	1-11
<p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHIEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
09. APRIL 1991		21. 05. 91
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT		ERSENDEZ Y BRA F.

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/AT 91/00003**

SA 43174

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

09/04/91

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4195130	25-03-80	Keine	
US-A-4059485	22-11-77	BE-A- 860413	03-05-78
		CA-A- 1093994	20-01-81
		DE-A, C 2749022	18-05-78
		FR-A, B 2370095	02-06-78
		GB-A- 1535490	13-12-78
		JP-C- 1401531	28-09-87
		JP-A- 53059091	27-05-78
		JP-B- 62009318	27-02-87
		SE-B- 432778	16-04-84
		SE-A- 7712376	04-05-78
FR-A-2444466	18-07-80	AT-A- 358167	25-08-80
		BE-A- 880732	16-04-80
		CH-A- 644271	31-07-84
		DE-A, C 2950004	03-07-80
		GB-A, B 2038179	23-07-80
		SE-B- 447789	15-12-86
		SE-A- 7910054	23-06-80
		SU-A- 1318149	15-06-87

EPO FORM P003

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82